



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de genes asociados a la
producción de ramnolípidos en microorganismos
aislados de ambientes contaminados por petróleo en el
Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

AUTOR

Roger Alberto PALOMINO HUARCAYA

ASESOR

Fernando Abilio MERINO RAFAEL

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Palomino, R. (2018). *Caracterización molecular de genes asociados a la producción de ramnolípidos en microorganismos aislados de ambientes contaminados por petróleo en el Perú*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 152-UPG-FCB-2017

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 9:10 horas del día 16.2.2018 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno	e integrado por
Dr. Pedro Luis Castellanos Sánchez	(Miembro)
Mg. Mario Alcarraz Curi	(Miembro)
Mg. Jorge León Quispe	(Miembro)
Mg. Fernando Abilio Merino Rafael	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **ROGER ALBERTO PALOMINO HUARCAYA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 152-UPG-FCB-17, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“Caracterización molecular de genes asociados a la producción de ramnolípidos en microorganismos aislados de ambientes contaminados por petróleo en el Perú”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

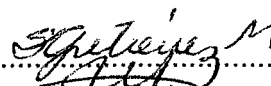
UNIDAD DE POSGRADO

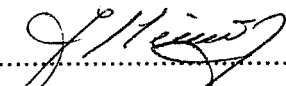
Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Muy Bueno con la nota de 18


A continuación el Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular al Bachiller Roger Alberto Palomino Huarcaya

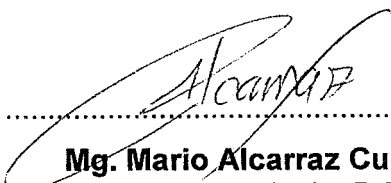
Siendo las 10:35 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

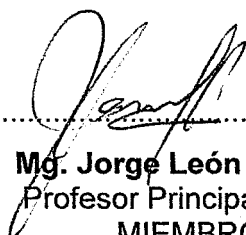
Se extiende la presente Acta en Lima, a los 16 días del mes de febrero del año 2018.


Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno
Profesora Principal a T.C.
PRESIDENTE


Mg. Fernando A. Merino Rafael
Profesor Principal a T.C.
ASESOR


Dr. Pedro Luis Castellanos Sánchez
Profesor Principal a T. C.
MIEMBRO


Mg. Mario Alcarraz Curi
Profesor Principal a D.E.
MIEMBRO


Mg. Jorge León Quispe
Profesor Principal a T.C.
MIEMBRO

RESUMEN

En Perú, es necesario conocer la biodiversidad microbiana de suelos contaminados con petróleo. *Pseudomonas aeruginosa* ha sido conocido como el microorganismo mas frecuente en este tipo de ambientes, llegando a convertirse en una herramienta biotecnológica en procesos de biorremediación microbiana por su capacidad degradadora, emulsificante y capacidad productora de biosurfactante de tipo ramnolípido.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar los genes asociados a la producción de ramnolípidos en 61 cepas bacterianas provenientes de la colección del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Univerdiad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Estas cepas han sido aisladas de diferentes ambientes contaminados con crudo de petróleo y fueron clasificados como superproductores de ramnolípidos (n=21), productores de ramnolípidos (n=20) y no productoras de ramnolípidos (n=20).

La identificación molecular de los microorganismos usando el gen 16s rRNA estuvo precedida por la identificación bioquímica de las 61 cepas seleccionadas utilizando el sistema API 20 NE. Los cebadores para la detección de los genes *rhl* fueron diseñados por el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de México (UNAM). Se utilizó PCR y el software FinchTV para el secuenciamiento de la región génica *rhlABR* y el programa MUSCLE para el análisis bioinformático. Cuatro especies fueron seleccionadas: *P.aeruginosa* T2K2, *P. aeruginosa* III T1P2, *P. aeruginosa* 6K-11, *P. aeruginosa* ATCC 9027; y fueron comparadas molecularmente con *P. aeruginosa* PAO1.

Se encontró que el 71,4 % y el 90,0% de las cepas superproductoras de ramnolípidos y de las cepas productoras de ramnolípidos, fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, especies como *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* y *Chryseobacterium indologenes*, fueron también identificadas. Del mismo modo, 55,0% de microorganismos no productores también fueron caracterizadas como *P.aeruginosa*.

Las regiones génicas *rhIAB*, *rhIC* y *rhIR* presentadas en las cepas superproductoras y productoras de ramnolípidos y las secuencias de todas las cepas mostraron el mismo patrón entre ellas y el estándar *P. aeruginosa* PAO1. Los resultados muestran que los genes estudiados en las cepas seleccionadas son sinónimos con sus homólogos en la cepa estándar *P. aeruginosa* PAO1, de modo que las diferencias genotípicas que expliquen la sobreproducción de ramnolípidos debieran hallarse en otros marcadores moleculares no cubiertos en este estudio.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, *quorum sensing*, ramnolípidos, *rhIAB*, *rhIC*.

ABSTRACT

In Perú, it is necessary to know the microbial biodiversity of soil polluted with oil. *Pseudomonas aeruginosa* was known as the most common microorganism in this kind of environments becoming in a biotechnological tool in bioremediation process according to degradative, emulsifying and rhamnolipidic (RL) biosurfactant production abilities.

The aim of this research was characterize the genes associated to the production of rhamnolipids in 61 bacterial strains belonging to the collection of the Microbiology and Microbial Biotechnology Laboratory of the UNMSM, Peru. These strains were isolated from different environments contaminated with crude oil and were classified as RL overproducers (n= 21), RL producers (n = 20) and non-producers (n = 20).

Molecular identification using the 16S rRNA gene was preceded by the biochemical identification of 61 strains selected with the API 20 NE system. The primers for detecting the *rhl* genes were designed at Molecular Biology Laboratory of the Universidad Autónoma de México. PCR was used and the software FinchTV for the sequencing of the *rhlABR* gene region and the programme MUSCLE for the bioinformatic analysis. Four species were selected: *P. aeruginosa* T2K2, *P. aeruginosa* III T1P2, *P. aeruginosa* 6K-11 and *P. aeruginosa* ATCC 9027, and were molecularly compared with *P. aeruginosa* PAO1.

It was found that 71,4 % of the RL overproducers and 90,0 % RL producers strains were identified as *P. aeruginosa*. Species such as *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Chryseobacterium indologenes*, were also identified. In the same way, 55,0 % of non-producers microorganisms were also characterized as *P.aeruginosa*.

The *rhlAB*, *rhlC* and *rhlR* gene regions presented in the RL overproducers and RL producers strains and the sequences of all the strains showed the same pattern between them and with the standard *P.aeruginosa* PAO 1. The results show that the genes studied in the selected strains are synonymous with their homologues in the standard strain *P. aeruginosa* PAO1, so that the

genotypical differences that explain the overproduction of rhamnolipid should be found in other molecular markers not covered in this study.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *quorum sensing*, rhamnolipids, *rhIAB*, *rhIC*.